

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Фалькова Марина Тахировна

**Циклический инъекционный анализ лекарственного растительного сырья  
с вскрытием проб в УЗ-поле**

Специальность 02.00.02 – аналитическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Санкт-Петербург – 2014

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»

- Научный руководитель:** доктор химических наук  
**Булатов Андрей Васильевич**  
ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»,  
доцент кафедры аналитической химии
- Официальные оппоненты:** **Гармонов Сергей Юрьевич**  
доктор химических наук, профессор,  
ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»,  
профессор кафедры аналитической химии,  
сертификации и менеджмента качества
- Яковлев Константин Иванович**  
кандидат химических наук, доцент  
ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия»  
доцент кафедры аналитической химии
- Ведущая организация:** ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (г. Москва)

Защита состоится «16» октября 2014 г. в 17:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.232.37 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата химических наук на базе Санкт-Петербургского государственного университета по адресу: 199004, Санкт-Петербург, Средний проспект В.О., д. 41/43, Большая химическая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. А.М. Горького Санкт-Петербургского государственного университета и на сайте [srbu.ru](http://srbu.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» июля 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
к. ф.-м. н.

/В.В. Панчук/

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

### Актуальность проблемы

Среди большого ассортимента лекарственных средств, производимых в мире, доля препаратов растительного происхождения составляет 25–30 %, а в некоторых фармакотерапевтических группах достигает 80 %. Повышенное внимание к лекарственному растительному сырью (ЛРС) отражает мировую тенденцию к увеличению числа лекарственных препаратов (ЛП) на растительной основе.

Постоянно возрастающие требования к контролю качества растительного сырья вызывают необходимость разработки оперативных методов оценки содержания в нем биологически активных веществ (БАВ). При необходимости выполнения массовых анализов важнейшими критериями выбора аналитических методов являются: минимизация трудовых затрат на их выполнение, а также радикальное сокращение расходов проб, реагентов и образующихся отходов. Общим решением всех перечисленных проблем является автоматизация и миниатюризация аналитических процедур на принципах проточных методов анализа, удовлетворяющих основным принципам «зеленой аналитической химии».

Проточные методы предполагают анализ растворов, поэтому твердые образцы различного происхождения, в том числе ЛРС, требуют предварительной пробоподготовки в условиях гидравлической схемы (растворение легкорастворимых твердофазных проб или извлечение аналитов), чтобы сформировать жидкую пробу аналита. Дальнейшее образование его аналитической формы в ранее предложенных схемах проточного анализа происходит при смешении зон раствора пробы и растворов реагентов в процессе их перемещения в потоке носителя через смесительную спираль в детектор. В этом случае не обеспечивается эффективное смешение этих зон, а соответственно и установление термодинамического равновесия в аналитической реакции. Кроме того, в процессе перемещения зоны пробы в потоке носителя по гидравлическим трассам происходит ее дисперсия. Эти явления приводят к снижению чувствительности анализа.

Актуальной задачей является поиск новых инструментальных методических решений, которые позволяли бы обеспечить полную автоматизацию анализа ЛРС с сохранением чувствительности применяемых методик.

Обеспечить полноту протекания аналитических реакций и устранить дисперсию пробы в потоке носителя позволяют проточные методы, включающие стадию конвективного перемешивания зон пробы и растворов реагентов в смесительных камерах. К числу таких проточных методов относится циклический инъекционный анализ (ЦИА), унифицированная аэрогидравлическая схема которого позволяет осуществлять различные операции пробоподготовки. Новые эффективные методические приемы призваны расширить аналитические возможности ЦИА.

Актуальность исследований в направлении решения данной проблемы подтверждается их поддержкой со стороны Российского фонда фундаментальных исследований (*грант 13-03-00031-а*), Правительства Санкт-Петербурга (*постановление Правительства Санкт-Петербурга от 25.06.2010 № 823*) и International Visegrad Fund (*Visegrad Scholarship от 09.05.2013*). Полученные результаты отмечены присуждением диплома I-ой степени на конкурсе научно-исследовательских работ в области фармацевтики и биотехнологий «IPhEB Science – 2012».

### **Цель работы**

Цель данного исследования – разработка общей схемы автоматизации анализа лекарственного растительного сырья на принципах циклического инъекционного анализа с извлечением аналитов в раствор в ультразвуковом поле и подтверждение ее аналитических возможностей на методиках определения биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

- разработать общую аэрогидравлическую схему ЦИА для автоматизированного анализа лекарственного растительного сырья с извлечением аналитов в раствор в ультразвуковом (УЗ) поле;
- установить и оптимизировать условия извлечения флавоноидов, аскорбиновой кислоты (АК) и антрахинонов из лекарственного растительного сырья в раствор под действием УЗ;
- установить возможность применения растворов поверхностно-активных веществ в качестве катализаторов спектрофотометрической реакции флавоноидов с ионами алюминия (III);
- проиллюстрировать возможности циклического инъекционного анализа с вскрытием проб в УЗ-поле на примерах автоматизированного спектрофотометрического определения флавоноидов, аскорбиновой кислоты и антрахинонов в лекарственном растительном сырье;
- апробировать разработанные методики на реальных объектах и подтвердить правильность получаемых результатов референтными методами.

### **Научная новизна работы**

Разработана общая аэрогидравлическая схема циклического инъекционного анализа лекарственного растительного сырья, включающая извлечение аналитов из нерастворимых твердофазных проб в раствор в УЗ-поле для их последующего спектрофотометрического определения.

Исследованы реакции образования комплексов флавоноидов с ионами алюминия (III) в растворах цетилпиридиния хлорида (ЦПХ), додецилсульфата натрия и Triton X-100 и установлена возможность применения ЦПХ в качестве катализатора данной спектрофотометрической реакции. Получены данные о кинетике реакции комплексообразования рутина с ионами алюминия (III) в присутствии ЦПХ.

Найдены оптимальные условия извлечения антрахинонов, аскорбиновой кислоты и флавоноидов из лекарственного растительного сырья в раствор под действием УЗ для их экспрессного спектрофотометрического определения.

### **Практическая значимость работы**

Разработана схема ЦИА, обеспечивающая полную автоматизацию анализа лекарственного растительного сырья и его максимальную чувствительность.

Разработаны и апробированы на реальных объектах циклические инъекционные спектрофотометрические методики:

- определения общего содержания флавоноидов в лекарственном растительном сырье, обеспечивающая возможность существенного сокращения времени анализа, расходов реагентов и образующихся отходов;
- определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье и продуктах питания, обеспечивающая экспрессное выполнение массовых анализов;

– определения общего содержания антрахинонов в лекарственном растительном сырье, обеспечивающая замену органических экстрагентов на водные растворы ПАВ.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Общая аэрогидравлическая схема циклического инъекционного анализа лекарственного растительного сырья с ультразвуковым вскрытием проб.
2. Обоснование возможности применения растворов поверхностно-активных веществ в качестве катализаторов спектрофотометрической реакции флавоноидов с ионами алюминия (III) и схема спектрофотометрического анализа на ее основе.
3. Обоснование условий извлечения флавоноидов, аскорбиновой кислоты и антрахинонов из лекарственного растительного сырья в раствор под действием УЗ для их экспрессного спектрофотометрического определения.
4. Методика циклического инъекционного спектрофотометрического определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье и продуктах питания, включающая ее автоматизированное извлечение в УЗ-поле, и результаты её испытаний.
5. Методики циклического инъекционного спектрофотометрического определения общего содержания флавоноидов и антрахинонов в лекарственном растительном сырье, включающие автоматизированное извлечение аналитов в УЗ-поле, и результаты их испытаний.

#### **Личный вклад соискателя**

Автор принимал участие в дискуссиях по уточнению цели и задач исследования, планировании экспериментальных исследований. Все экспериментальные исследования выполнены лично автором. Соискатель принимал активное участие в обсуждении и интерпретации полученных результатов, написании статей, подготовке и представлении докладов на Всероссийских и международных конференциях.

#### **Апробация работы**

Материалы диссертации были представлены на 11 конференциях: VI Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Менделеев-2012» (Санкт-Петербург, 2012), XII International conference on Flow Analysis «Flow Analysis XII» (Греция, 2012), LXXIII Научно-практической конференции «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2012 (Санкт-Петербург, 2012), IV Всероссийской конференции «Аналитические приборы» (Санкт-Петербург, 2012), Санкт-Петербургском международном форуме «Фармацевтика. Медицинская промышленность. Биотехнологии» (Санкт-Петербург, 2012), Всероссийской школе-конференции «Химия биологически активных веществ» молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием «ХимБиоАктив-2012» (Санкт-Петербург, 2012), VII Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам «Менделеев-2013» (Санкт-Петербург, 2013), III Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2013), Первой зимней молодежной школе-конференции с международным участием «Новые методы аналитической химии» (Санкт-Петербург, 2013), 18<sup>th</sup> International conference ICFA (Португалия, 2013), VIII Всероссийской конференции с международным участием молодых ученых по химии «Менделеев-2014» (Санкт-Петербург, 2014).

### **Публикация результатов**

Материалы диссертации опубликованы в 3 статьях в отечественных и зарубежных журналах и в форме тезисов докладов 11 конференций.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения; общего обзора литературы по проточным методам фармацевтического анализа, фармакологическим и биологическим свойствам флавоноидов, аскорбиновой кислоты и антрахинонов, а также методам их определения; методики экспериментальных исследований; главы, посвященной аэрогидравлической схеме ЦИА ЛРС, включающей извлечение аналитов в раствор в УЗ-поле, и трёх экспериментальных глав (4, 5, 6), посвященных разработке методик анализа на принципах ЦИА; выводов и списка цитируемой литературы (135 наименований). Работа изложена на 112 страницах текста, содержит 14 таблиц и 43 рисунка.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во введении кратко обосновывается актуальность разработки аэрогидравлической схемы циклического инъекционного спектрофотометрического анализа ЛРС с извлечением аналитов в раствор в УЗ-поле. Формулируются цель и задачи исследования.

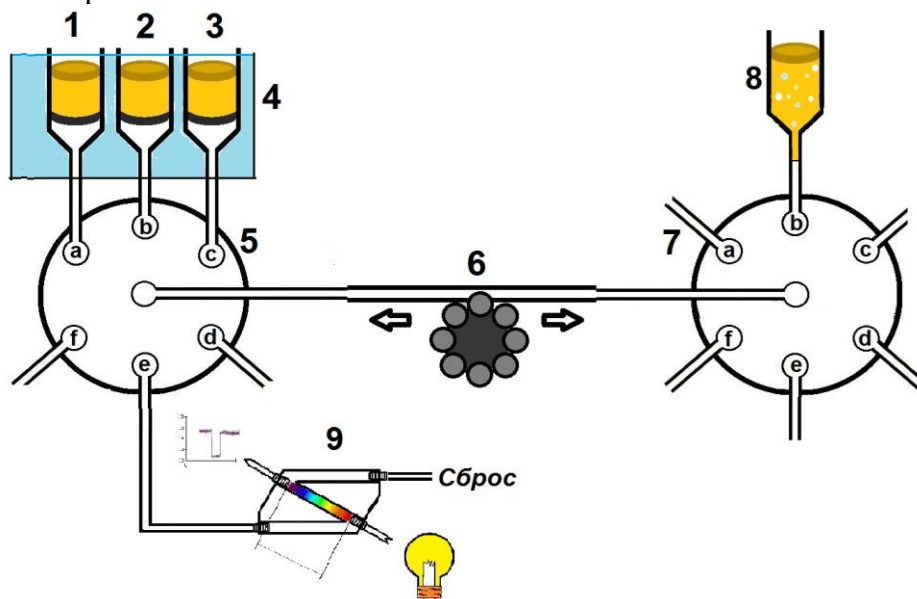
### **Глава 1. Обзор литературы**

В первой главе представлен обзор литературы, в котором последовательно рассматриваются возможные общие подходы к автоматизации фармацевтического анализа на принципах проточных методов. Сопоставляются их преимущества и недостатки. Последовательно рассматриваются известные проточные методы, применимые при определении различных БАВ в ЛРС и ЛП. Обсуждаются проблемы автоматизации стадии пробоподготовки в проточных методах. Акцентируется внимание на возможных способах детектирования аналитов, в том числе на преимуществах спектральных методах детектирования. Отмечается, что большинство известных автоматизированных методик в условиях проточного анализа предполагают неравновесные условия образования аналитических форм. В качестве возможной альтернативы неравновесным методам рассматриваются равновесные: проточно-порционный и циклический инъекционный анализ, в которых обеспечивается смешение пробы и растворов реагентов в специальных смесительных камерах, что и обеспечивает возможность создания равновесных условий образования аналитических форм. Представлены фармакологические и биологические свойства флавоноидов, антрахинонов и аскорбиновой кислоты, а также методы их определения. В заключение этой главы обосновывается актуальность поиска методических решений, которые позволили бы автоматизировать процесс извлечения БАВ из проб ЛРС непосредственно в условиях ЦИА.

### **Глава 2. Аэрогидравлическая схема циклического инъекционного анализа лекарственного растительного сырья с вскрытием проб в УЗ-поле, и ее обоснование**

Для создания условий полной автоматизации процесса извлечения аналитов из твердофазных проб ЛРС для их последующего определения, в отличие от ранее

предложенных схем ЦИА, в разработанной схеме (рис. 1) предполагается коммутация нескольких кранов-переключателей и включение в качестве вспомогательных устройств пробоподготовки (ВУП) специальных картриджей с политетрафторэтиленовыми (ПТФЭ) фильтрами, которые помещены в УЗ-ванну с регулируемыми температурными режимами и коммутируются с каналами одного из кранов. Число картриджей ограничено количеством каналов используемого крана. В картриджах производится экстракционное извлечение аналитов из ЛРС и последующее отделение экстракта от «отработанного» сырья. Второй кран предназначен для автоматизации процесса образования аналитической формы в реакционной емкости (РЕ) при смешении в ней экстракта и растворов реагентов потоком газовой фазы.



**Рис. 1.** Принципиальная схема циклического инъекционного анализа лекарственного растительного сырья с вскрытием проб в УЗ-поле: 1, 2, 3 – картриджи с ПТФЭ фильтрами; 4 – УЗ-ванна; 5, 7 – многоходовые краны-переключатели; 6 – перистальтический реверсивный насос; 8 – реакционная емкость; 9 – проточная кювета, подключенная с помощью оптоволоконных кабелей к источнику света и спектрометру.

В картриджи воронкообразной формы (высота – 50 мм, внутренний диаметр – 5 мм) помещены пористые ПТФЭ фильтры соответствующих размеров, изготовленные из порошка ПТФЭ (Фторопласт-4) двухстадийным спеканием с промежуточным изготовлением ПТФЭ пластины и отборкой фракции частиц с размером 0,45 – 0,9 мм.

Разработанная аэрогидравлическая схема обеспечивает возможность полной автоматизации процесса извлечения аналитов из твердофазных проб ЛРС и их последовательное детектирование в равновесных условиях.

### Глава 3. Методика экспериментальных исследований

В данной главе описаны средства измерений, вспомогательные устройства и оборудование, реактивы и материалы, а также процедуры приготовления растворов необходимых реагентов.

#### Глава 4. Разработка методики циклического инъекционного спектрофотометрического определения флавоноидов в лекарственном растительном сырье

Первой иллюстрацией возможностей ЦИА в модифицированном под анализ ЛРС варианте явилась автоматизация методики определения флавоноидов в различном ЛРС. На основе обзора известных решений проблемы определения флавоноидов в ЛРС и ЛП был сделан вывод, что для проточного определения флавоноидов в растительном сырье наиболее предпочтителен спектрофотометрический метод детектирования, обеспечивающий надежность и простоту анализа. Для определения флавоноидов была выбрана известная селективная реакция образования их комплексов с ионами алюминия (III). Выбранная реакция рекомендована для определения флавоноидов в ЛРС Государственной фармакопеей XI издания. Однако эта реакция является кинетически замедленной.

Общим решением для преодоления кинетических ограничений при образовании аналитических форм является проведение фотометрических реакций в средах ПАВ за счет катализа подобных аналитических реакций. Но возможность реализации подобного решения для случая определения флавоноидов требовала экспериментальной проверки, так как ранее не была изучена.

Влияние катионных, анионных и неионогенных ПАВ на скорость образования аналитической формы рутина было исследовано на примерах цетилпиридиния хлорида (ЦПХ), додецилсульфата натрия и Triton X-100 соответственно, и представлено на рис. 2.

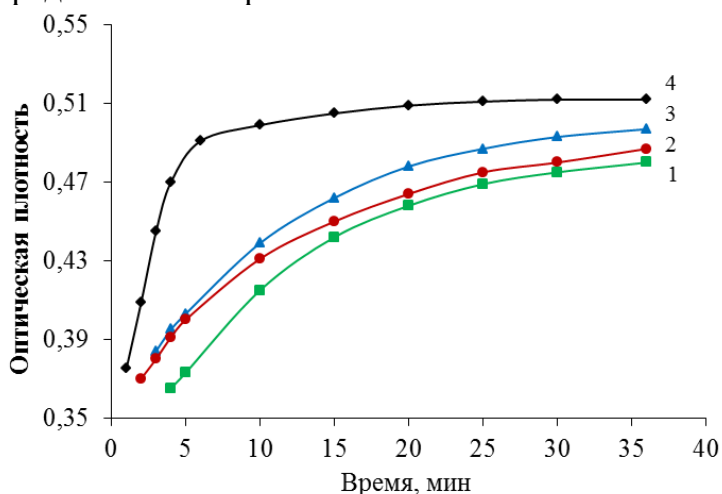


Рис. 2. Влияние различных ПАВ на скорость образования комплекса рутина с ионами алюминия (III): 1 – без ПАВ; 2 – Triton X-100; 3 – додецилсульфат натрия; 4 – ЦПХ ( $C(\text{рутин}) = 0,8 \text{ мМ}$ ,  $C(\text{ПАВ}) = 2,8 \text{ мМ}$ ,  $C(\text{Al (III)}) = 40 \text{ мМ}$ ).

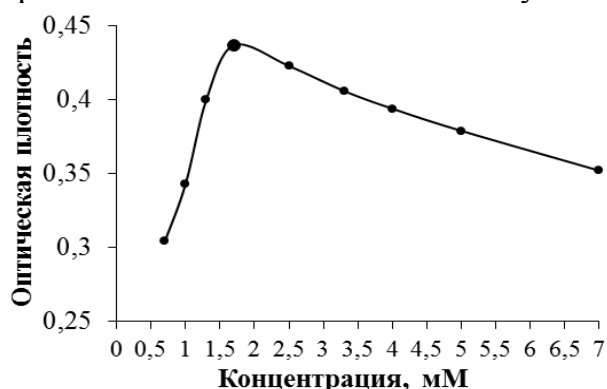
Согласно полученным данным, при прочих равных условиях добавление любого из ПАВ приводит к увеличению оптической плотности раствора. Максимальный эффект проявляется в присутствии ЦПХ (рис. 2, кривая 4). В этом случае скорость протекания фотометрической реакции значительно возрастает. Для достижения близкого к максимальному значению оптической плотности достаточно 5 мин вместо 30 мин (без ПАВ). В данных условиях формируются комплексы, обусловленные взаимодействием молекул катионных ПАВ с молекулами флавоноидов, которые в свою очередь образуют агрегативно устойчивые и интенсивно окрашенные растворы аналитических форм с ионами алюминия (III). Кроме того, введение ЦПХ приводит к увеличению молярного коэффициента светопоглощения. При этом молярный коэффициент светопоглощения комплекса рутина с ионами алюминия (III) равен  $1,9 \cdot 10^4 \text{ л/моль} \cdot \text{см}$  ( $\lambda = 415 \text{ нм}$ ), а без введения ЦПХ –  $1,6 \cdot 10^4 \text{ л/моль} \cdot \text{см}$  соответственно.



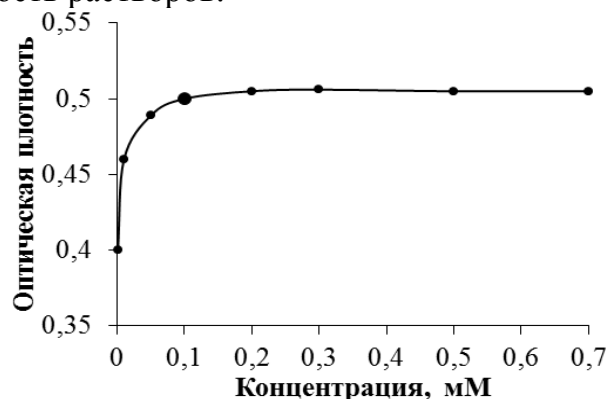
Константы скоростей реакций комплексообразования рутина с ионами алюминия (III) в присутствии и без ЦПХ были найдены путем построения кинетических зависимостей, которые составили соответственно  $(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^4$  и  $(8,8 \pm 0,1) \cdot 10^3 \text{ мин}^{-1} \cdot \text{моль}^{-2} \cdot \text{л}^2$ . Из полученных данных следует, что в присутствии ЦПХ скорость спектрофотометрической реакции удваивается.

Для достижения оптимальных условий протекания спектрофотометрической реакции было изучено влияние концентрации ионов алюминия (III) и ЦПХ. Экспериментально были выбраны значения концентраций ионов алюминия (III) и ЦПХ равные 1,7 и 0,1 мМ соответственно в качестве оптимальных (рис. 3 и 4).

При оптимизации условий выполнения анализа по ЦИ-схеме было изучено влияние температуры на процесс образования аналитической формы рутина в диапазоне от 20 °С до 50 °С. Было установлено, что повышение температуры практически не влияет на оптическую плотность растворов.



**Рис. 3.** Влияние концентрации ионов алюминия (III) на оптическую плотность раствора аналитической формы рутина ( $C(\text{рутин}) = 50 \text{ мкМ}$ ,  $C(\text{ЦПХ}) = 0,1 \text{ мМ}$ ).

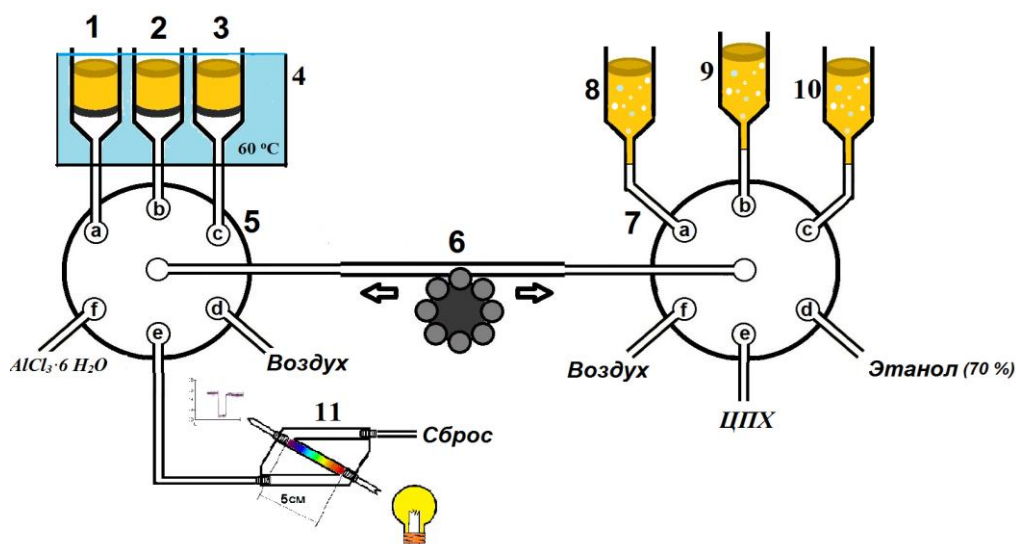


**Рис. 4.** Влияние концентрации ЦПХ на оптическую плотность раствора аналитической формы рутина ( $C(\text{рутин}) = 50 \text{ мкМ}$ ,  $C(\text{Al (III)}) = 1,7 \text{ мМ}$ ).

Для различного сырья (травы зверобоя, цветков ромашки и календулы) была изучена возможность извлечения флавоноидов в растворы различных ПАВ и этанола. Установлено, что оптимальные условия извлечения флавоноидов с точки зрения минимизации временных затрат и реактивов – нагревание 0,1 г пробы в УЗ-ванне (130 Вт, 35 кГц) при 60 °С с 2 мл 70 % этилового спирта в течение 10 мин. При найденных условиях наблюдается максимальная эффективность извлечения.

В варианте методики, адаптированной к разработанной схеме ЦИА, в три съемных картриджа (1, 2, 3) помещали по 0,1 г измельченной пробы (размер частиц меньше 1 мм) (рис. 5). Далее все картриджи подключали к многоходовому крану (5) и помещали в УЗ-ванну (4). После этого в каждый картридж последовательно подавали по 2 мл 70 % этанола (кран 7, *d*) через краны (5 и 7) с помощью перистальтического насоса (6). Затем в течение 10 мин производили УЗ воздействие при температуре 60 °С на пробы в картриджах.

На следующем этапе через краны (5, 7) с помощью реверсивного насоса (6) в РЕ (8, 9, 10) последовательно подавали по 100 мкл экстрактов, полученных в картриджах (1, 2, 3), 300 мкл 1,7 мМ  $\text{AlCl}_3$  (5, *f*) и 300 мкл 0,1 мМ ЦПХ (7, *e*). Растворы в РЕ (8, 9, 10) перемешивали потоком воздуха (кран 5, *d*) в течение 10 с со скоростью 6 мл/мин и выдерживали 5 мин при температуре 25 °С.



**Рис. 5.** Схема ЦИ-определения флавоноидов в ЛРС: 1, 2, 3 – картриджи с ПТФЭ фильтрами; 4 – УЗ-ванна; 6 – перистальтический реверсивный насос; 5, 7 – многоходовые краны-переключатели; 8, 9, 10 – реакционные емкости; 11 – проточная кювета, подключенная с помощью оптоволоконных кабелей к источнику света и спектрометру.

На следующем этапе растворы аналитических форм из РЕ (8, 9, 10) при переключении кранов-переключателей (5, 7) и реверса насоса (6) последовательно перекачивали в кювету (11) спектрофотометрического детектора, измеряли оптическую плотность растворов пробы ( $\lambda = 415$  нм) в условиях остановленного потока в течение 10 с и растворы сбрасывали.

Затем коммуникации системы промывали 70 % раствором этанола (7, d) и измеряли фоновый сигнал при заполнении кюветы смешанным раствором экстракта, 70 % раствора этанола и 0,1 мМ ЦПХ (1:3:3). Разность сигналов пробы и фона использовалась для расчета содержания флавоноидов в ЛРС.

В работе было изучено влияние на результаты определения флавоноидов некоторых соединений, вступающих в реакции комплексообразования с ионами алюминия (III), имеющих фенольные, карбоксильные и гидроксильные группы на модельных спиртовых растворах рутина. Было обнаружено мешающее влияние сахаров, в том числе глюкозы, при их 10-кратном избытке.

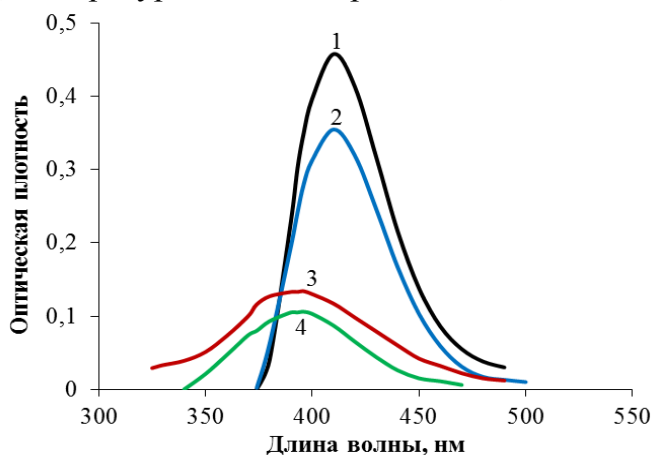
Аналитические характеристики разработанной методики представлены в табл. 1. Разработанная методика в отличие от ранее предложенных проточных аналогов обеспечила полную автоматизацию анализа, включая стадию извлечения флавоноидов из ЛРС в раствор.

**Табл. 1.** Аналитические характеристики циклической инъекционной спектрофотометрической методики определения флавоноидов в ЛРС.

Параметр	Оптимальное значение
Концентрация ЦПХ (мМ)	0,1
Концентрация Al (III) (мМ)	1,7
Объем экстрагента (мл)	2
Время извлечения (мин)	10
Температура извлечения (°С)	60
Время спектрофотометрической реакции (мин)	5
Температура реакции (°С)	25

Диапазон определяемых концентраций (%)	0,36 – 8
Предел обнаружения (%)	0,1
Коэффициент корреляции	0,999
Sr, % (n = 5)	3
Производительность (проб/час)	8

Разработанная методика была апробирована при определении флавоноидов в различном ЛРС (табл. 2). Расчет содержания флавоноидов в анализируемом растительном сырье осуществляли в пересчете на рутин, так как все максимумы в спектрах поглощения аналитических форм исследуемого растительного сырья практически совпадали с максимумом поглощения аналитической формы рутина (рис. 6). Расчет проведен с учетом потери в массе сырья при высушивании (температура – 150 °С, время – 1 ч).



**Рис. 6.** Спектры поглощения растворов аналитических форм: 1 – рутин; 2 – травы зверобоя; 3 – цветков ромашки, 4 – цветков календулы (С(рутин) – 0,8 мМ, С(ЦПХ) – 2,8 мМ, С(Al (III)) – 40 мМ).

Правильность полученных результатов подтверждена методом циклической вольтамперометрии. Результаты, полученные методами ЦИА с извлечением в УЗ-поле и циклической вольтамперометрии, были сравнены с помощью F- и t-тестов и представлены в таблице 2.

Полученные F-значения  $\leq 6,39$  указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения  $\leq 2,31$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между результатами, полученными при помощи двух методик.

**Табл. 2.** Результаты определения содержания флавоноидов в ЛРС (n=5, P=0,95).

ЛРС	Общее содержание флавоноидов*, %			
	ЦИА	Циклическая вольтамперометрия	F-значение	t-значение
Трава зверобоя	5,8±0,1	5,7±0,1	1,20	1,63
Цветки ромашки	2,20±0,05	2,15±0,04	1,50	1,30
Цветки календулы	1,09±0,03	1,03±0,04	1,40	1,20

\* в пересчете на рутин

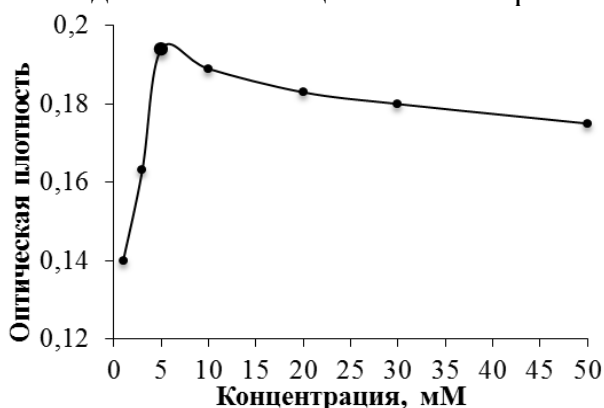
### Глава 5. Разработка методики циклического инъекционного спектрофотометрического определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье и продуктах питания

В качестве второй иллюстрации возможностей схемы ЦИА с извлечением аналитов в УЗ-поле была разработана полностью автоматизированная методика

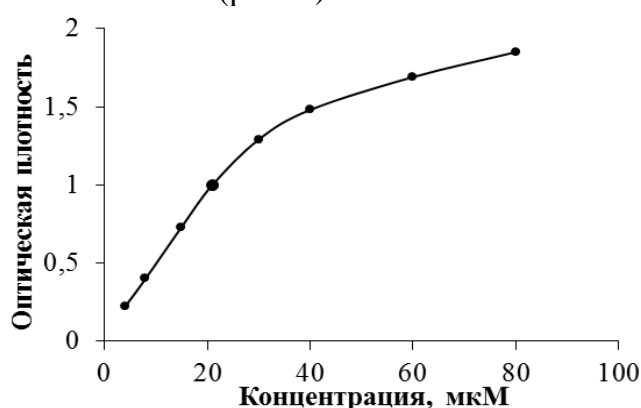
определения аскорбиновой кислоты в ЛРС и продуктах питания. Аскорбиновая кислота была выбрана в качестве аналита, так как она является важным водорастворимым антиоксидантом в организме человека.

Разработанная методика включает автоматизированное извлечение аскорбиновой кислоты из ЛРС и некоторых продуктов питания в водный раствор в картридже с фильтрами из пористого ПТФЭ с последующим ее спектрофотометрическим определением по реакции восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола (2,6-ДФИФ) в кислой среде. Выбранная реакция рекомендована для определения аскорбиновой кислоты в ЛРС Государственной фармакопеей XI издания.

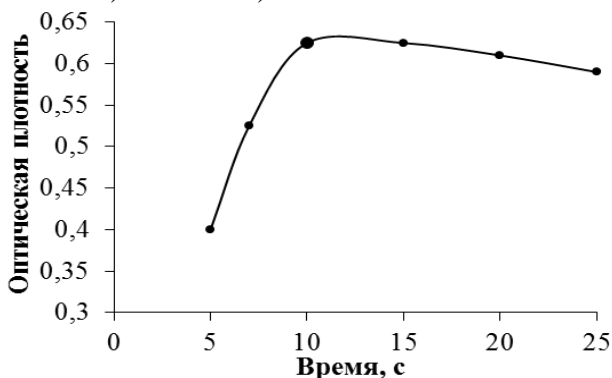
Для достижения оптимальных условий протекания спектрофотометрической реакции в условиях ЦИА было изучено влияние концентрации соляной кислоты и 2,6-ДФИФ. Экспериментально было выбрано значение концентрации соляной кислоты равное 5 мМ в качестве оптимального (рис. 7). При увеличении концентрации 2,6-ДФИФ больше 20 мкМ оптическая плотность раствора превышает 1 (рис. 8). Время перемешивания реакционной смеси в РЕ ЦИА должно быть достаточным, чтобы обеспечить гомогенизацию раствора и исключить возможное взаимодействие реагента с другими восстановителями. Было установлено, что при увеличении времени перемешивания экстрактов ЛРС с раствором реагента более 10 с наблюдается мешающее влияние примесных компонентов (рис. 9).



**Рис. 7.** Влияние концентрации соляной кислоты на оптическую плотность раствора ( $C(2,6\text{-ДФИФ}) - 7 \text{ мкМ}$ ,  $C(\text{аскорбиновой кислоты}) - 17 \text{ мкМ}$ ).



**Рис. 8.** Влияние концентрации 2,6-ДФИФ на оптическую плотность раствора ( $C(\text{HCl}) - 5 \text{ мМ}$ ).

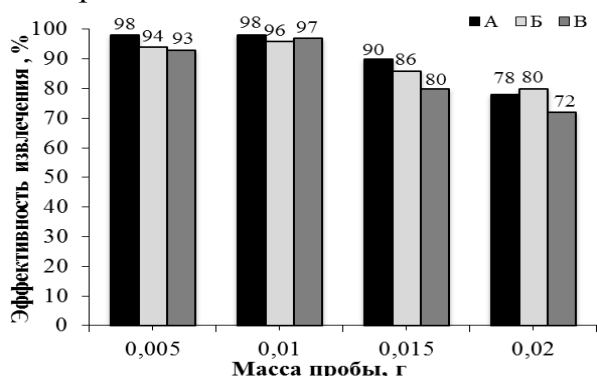


**Рис. 9.** Зависимость оптической плотности раствора от времени перемешивания экстракта листьев смородины с раствором 2,6-ДФИФ ( $C(2,6\text{-ДФИФ}) - 20 \text{ мкМ}$ ,  $C(\text{HCl}) - 5 \text{ мМ}$ , скорость потока воздуха – 6 мл/мин).

Для оптимизации процесса извлечения аскорбиновой кислоты из ЛРС и продуктов питания было исследовано влияние массы пробы, объема экстрагента и времени извлечения. Степень эффективности извлечения аскорбиновой кислоты рассчитывалась на основании результатов двух последовательных

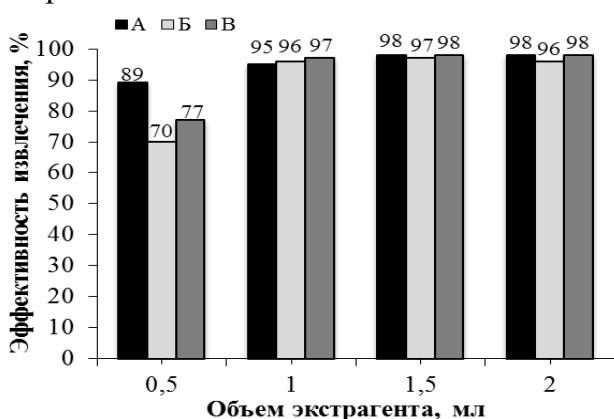
автоматизированных извлечений из одной и той же пробы с последующим спектрофотометрическим детектированием.

При изучении влияния массы навески были зафиксированы объем экстрагента – 1,5 мл и время извлечения в УЗ-ванне (130 Вт, 35 кГц) – 10 мин при температуре 25 °С. В картридж помещали от 0,005 до 0,02 г пробы (листья смородины, красный перец и яблочное пюре) и проводили циклическое инъекционное определение аскорбиновой кислоты. Далее из этой же пробы проводилось вторичное извлечение и определение аскорбиновой кислоты. На основании полученных результатов (рис. 10), масса всех исследованных проб равная 0,01 г была выбрана для дальнейших экспериментов.

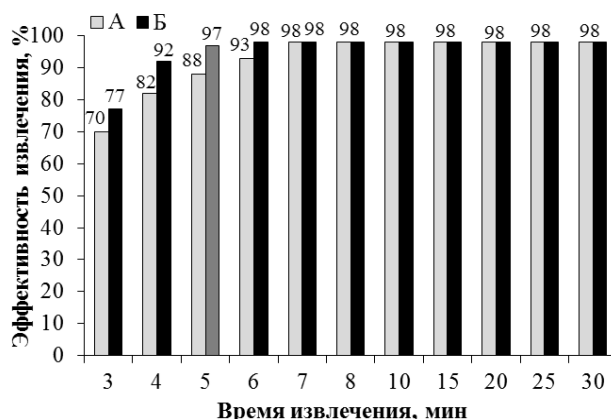


**Рис. 10.** Зависимость эффективности извлечения аскорбиновой кислоты от массы пробы в УЗ-поле: А – сладкий красный перец; Б – листья смородины; В – яблочное пюре (объем экстрагента – 1,5 мл, время извлечения – 10 мин, температура – 25 °С).

При изучении влияния объема экстрагента на полноту извлечения аскорбиновой кислоты из проб были зафиксированы масса пробы – 0,01 г и время извлечения в УЗ-ванне – 10 мин. Объем экстрагента варьировался в пределах от 0,5 до 2,0 мл. При изучении влияния времени извлечения аскорбиновой кислоты из проб были зафиксированы масса навески – 0,01 г, объем экстрагента – 1,5 мл. Время перемешивания пробы с экстрагентом в картридже потоком газа или под действием УЗ варьировалось в пределах от 3 до 30 мин. Из полученных результатов (рис. 11 и 12) следует, что объем экстрагента равный 1,5 мл и время извлечения в УЗ-поле равное 5 мин являются оптимальными. Извлечение проводилось при температуре 25 °С, так как при повышении температуры скорость разрушения аскорбиновой кислоты возрастает.



**Рис. 11.** Зависимость эффективности извлечения аскорбиновой кислоты от объема экстрагента в УЗ-поле: А – сладкий красный перец; Б – листья смородины; В – яблочное пюре (масса пробы – 0,01 г, время извлечения – 10 мин, температура – 25 °С).



**Рис. 12.** Зависимость эффективности извлечения аскорбиновой кислоты от времени: А – перемешивание воздухом (скорость потока воздуха – 6 мл/мин); Б – УЗ воздействие (объем экстрагента – 1,5 мл, масса пробы – 0,01 г, температура – 25 °С).

В соответствии с разработанной методикой в три съемных картриджа (1, 2, 3) помещали по 0,01 г пробы измельченного ЛРС (размер частиц меньше 1 мм) или пищевого продукта. Далее все картриджи (1, 2, 3) подключали к многоходовому крану (5) и помещали в УЗ-ванну (4) (рис. 1). После этого в каждый картридж последовательно подавали по 1,5 мл дистиллированной воды через краны (5 и 7) с помощью перистальтического насоса (6). Затем в течение 5 мин происходило извлечение аскорбиновой кислоты в водную фазу под действием УЗ.

После этого последовательно в РЕ (8) направляли 0,25 мл экстракта из картриджа (1), 0,1 мл 5 мМ раствора соляной кислоты (7, а) и 0,25 мл 20 мкМ раствора 2,6-ДФИФ (7, с) и поток воздуха (5, d) со скоростью 6 мл/мин в течение 10 с, обеспечивающий интенсивное перемешивание растворов в РЕ. На следующем этапе раствор аналитической формы из РЕ (8) при переключении кранов-переключателей (5, 7) и реверса насоса (6) перекачивали в кювету (9) спектрофотометрического детектора, измеряли оптическую плотность раствора ( $\lambda = 515$  нм) в условиях остановленного потока в течение 10 с и раствор сбрасывали.

Затем коммуникации системы промывали дистиллированной водой (7, d) и измеряли фоновый сигнал при заполнении кюветы смешанным раствором полученного экстракта, 5 мМ раствора соляной кислоты и дистиллированной воды (2,5:1:2,5).

После промывки системы проводили детектирование аскорбиновой кислоты в экстрактах, полученных во втором и третьем картриджах (2, 3).

Аналитические характеристики разработанной методики представлены в табл. 3. Разработанная методика в отличие от ранее предложенных проточных аналогов обеспечила полную автоматизацию анализа, включая стадию извлечения аскорбиновой кислоты из ЛРС и продуктов питания в раствор.

**Табл. 3.** Аналитические характеристики циклической инъекционной спектрофотометрической методики определения аскорбиновой кислоты в ЛРС и продуктах питания.

<b>Параметр</b>	<b>Оптимальное значение</b>
Концентрация соляной кислоты (мМ)	5
Концентрация 2,6-ДФИФ (мкМ)	20
Температура извлечения (°С)	25
Объем экстрагента (мл)	1,5
Масса пробы (г)	0,01
Время извлечения (мин)	5
Диапазон определяемых концентраций (%)	0,01 – 0,32
Предел обнаружения (%)	0,003
Коэффициент корреляции	0,999
Sr, % (n = 5)	7
Производительность (проб/час)	17

Разработанная методика апробирована на различном ЛРС и продуктах питания (табл. 4). Правильность полученных результатов подтверждена методом капиллярного электрофореза (КЭ) с ультрафиолетовым детектированием. Результаты, полученные методами ЦИА с извлечением в УЗ-поле и КЭ, были сравнены с помощью F- и t-тестов и представлены в таблице 4.

Полученные F-значения  $\leq 6,39$  указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения  $\leq 2,31$  указывают на то,

что нет статистически значимого различия между результатами, полученными при помощи двух методик.

**Табл. 4.** Результаты определения аскорбиновой кислоты в ЛРС и продуктах питания (n=5, P=0,95).

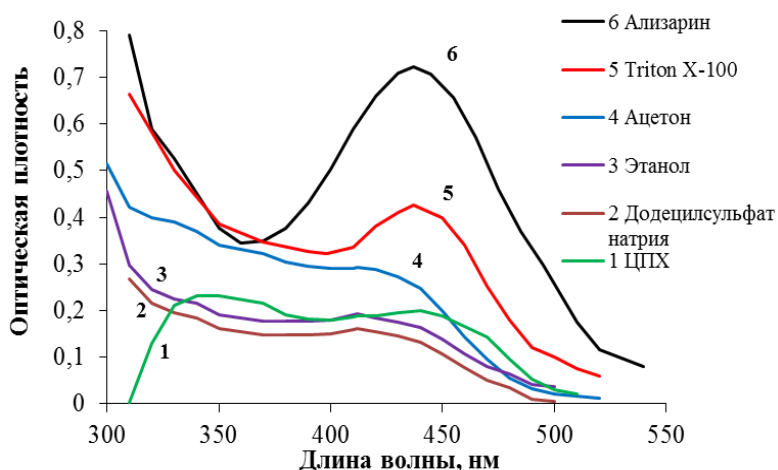
Проба	Общее содержание АК, %			
	ЦИА	КЭ	F-значение	t-значение
Листья смородины	0,21±0,01	0,20±0,02	1,90	1,70
Плоды рябины	0,14±0,01	0,12±0,01	2,30	2,07
Киви	0,18±0,01	0,180±0,005	2,10	0,86
Яблоко «Антоновка»	0,060±0,004	0,060±0,003	1,50	0,93
Сладкий красный перец	0,270±0,007	0,250±0,003	2,30	2,10
Яблочное пюре «Агуша»	0,15±0,01	0,13±0,02	1,35	2,20

### **Глава 6. Разработка методики циклического инъекционного спектрофотометрического определения общего содержания антрахинонов в лекарственном растительном сырье**

Следующей иллюстрацией возможностей ЦИА в модифицированном под анализ ЛРС варианте явилась автоматизация методики определения антрахинонов в различном ЛРС. В начале главы приведены известные решения проблемы определения антрахинонов, а также способы их извлечения из твердофазных проб. Исходя из литературных данных, антрахиноны, как правило, извлекают в органические растворители или в водную фазу при нагревании и под давлением. В данной работе реализован альтернативный метод извлечения антрахинонов из ЛРС, который включает в себя процесс мицеллярно-опосредованного извлечения (МОИ). Было установлено, что использование МОИ при температуре помутнения является эффективной альтернативой использованию органических растворителей для процесса извлечения. В данном случае раствор ПАВ, концентрация которого выше его критической концентрации мицеллообразования используется в качестве экстракционного растворителя. При такой концентрации молекулы ПАВ образуют мицеллы, которые способны извлекать из ЛРС целевые аналиты, предпочтительно неполярные.

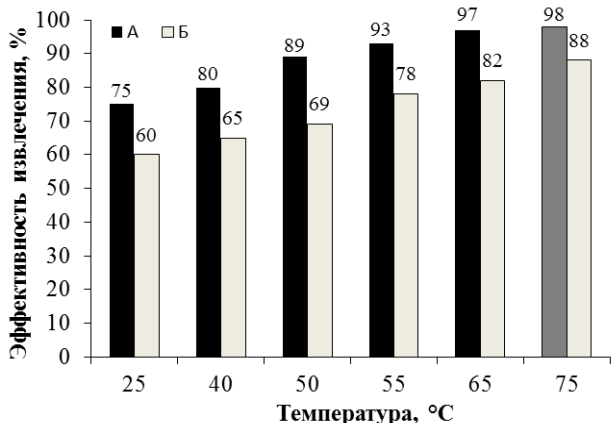
Для достижения эффективного извлечения антрахинонов из ЛРС были оптимизированы такие параметры, как состав экстрагента и его объем, время и температура извлечения в условиях ЦИА.

Различные экстрагенты, такие как ацетон (80 %), этанол, растворы ЦПХ, додецилсульфата натрия и Triton X-100 были изучены для извлечения антрахинонов из растительного материала. В ходе экспериментов было установлено, что наиболее полное извлечение антрахинонов наблюдается при использовании раствора Triton X-100 при температуре 75 °С (рис. 13).

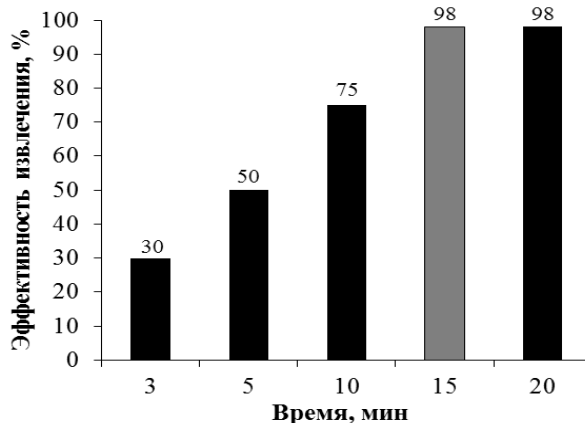


**Рис. 13.** Спектры поглощения ализарина в Triton X-100; экстрактов, полученных при извлечении антрахинонов из ЛРС в различные экстрагенты (объем экстрагента – 1,5 мл, время извлечения – 15 мин, масса пробы – 0,1 г, температура – 75 °С).

Два различных способа извлечения антрахинонов из ЛРС были изучены в диапазоне температур от 25 °С до 75 °С (рис. 14): извлечение без и с воздействием УЗ (130 Вт, 35 кГц). Время извлечения было зафиксировано – 15 мин. В ходе экспериментов было установлено, что в обоих случаях максимум аналитического сигнала наблюдается при температуре выше 65 °С, при этом процесс извлечения аналитов в УЗ-поле является более эффективным.



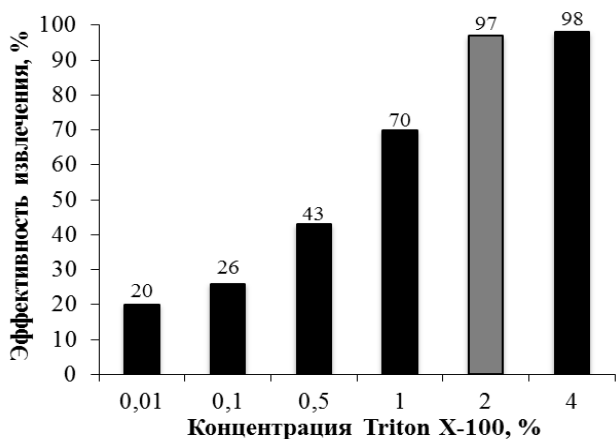
**Рис. 14.** Влияние температуры на эффективность извлечения антрахинонов из ЛРС: А – в УЗ-поле; Б – перемешивание воздухом (масса коры крушины – 0,1 г, время извлечения – 15 мин, объем экстрагента – 1,5 мл, концентрация раствора Triton X-100 – 2 %).



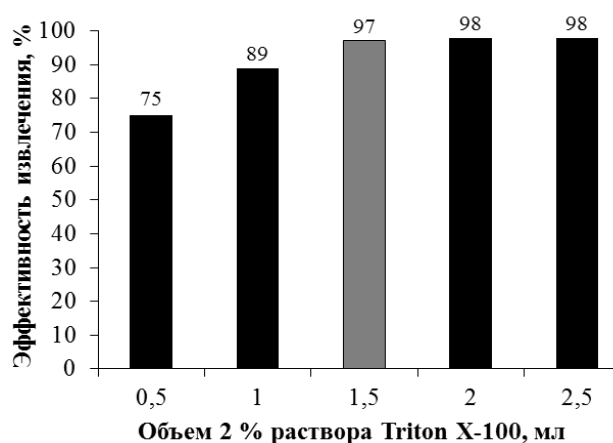
**Рис. 15.** Влияние времени на эффективность извлечения антрахинонов из ЛРС в УЗ-поле (масса корней и корневищ марены – 0,1 г, объем экстрагента – 1,5 мл, концентрация раствора Triton X-100 – 2 %, температура – 75 °С).

Для определения оптимального времени извлечения антрахинонов из ЛРС в УЗ-поле проводилась серия экспериментов при варьировании времени воздействия на пробы в УЗ-ванне при 75 °С в пределах от 3 до 20 мин. На основании полученных данных (рис. 15), оптимальным временем извлечения является 15 мин. Концентрация и объем раствора Triton X-100 в диапазоне от 0,01 до 4 % (рис. 16) и от 0,5 до 2,5 мл (рис. 17) соответственно были исследованы, и значения равные 2 % и 1,5 мл были выбраны в качестве оптимальных.





**Рис. 16.** Влияние концентрации Triton X-100 на эффективность извлечения антрахинонов из ЛРС в УЗ-поле (масса корней и корневищ марены – 0,1 г, время извлечения – 15 мин, объем экстрагента – 1,5 мл, температура – 75 °С).



**Рис. 17.** Влияние объема экстрагента на эффективность извлечения антрахинонов из ЛРС в УЗ-поле (масса корней и корневищ марены – 0,1 г, время извлечения – 15 мин, температура – 75 °С).

В окончательном варианте разработанной методики 0,1 г измельченного ЛРС (размер частиц меньше 1 мм) помещали в картриджи с ПТФЭ фильтрами (1, 2, 3) (рис. 1). Далее через краны (5, 7) с помощью реверсивного насоса (6) в картриджи (1, 2, 3) подавали по 1,5 мл 2 % раствора Triton X-100 (7, d). Проводили процесс извлечения антрахинонов в УЗ-ванне (4) при температуре 75 °С. Время извлечения антрахинонов из ЛРС составляло 15 мин. После этого через краны-переключатели (5 и 7) с помощью реверсивного насоса (6) в РЕ (8) подавали 0,25 мл экстракта пробы (5, a) из первого картриджа (1), 0,75 мл 2 % раствора Triton X-100 (7, d), 1 мл ацетатного буферного раствора (рН = 4,5) (5, f) и поток воздуха (5, d) в течение 10 с со скоростью 5 мл/мин, обеспечивающий интенсивное перемешивание растворов в РЕ (8).

На следующем этапе раствор аналитической формы из РЕ (8) при переключении кранов-переключателей (5, 7) и реверса насоса (6) перекачивали в кювету спектрофотометрического детектора (9), измеряли оптическую плотность раствора ( $\lambda = 435 \text{ nm}$ ) ( $A_n$ ) и раствор сбрасывали.

Затем коммуникации системы промывали 2 % раствором Triton X-100 (7, d) и проводили аналогичные действия с извлечениями, полученными во втором и третьем картриджах (2, 3).

На заключительном этапе измеряли фоновый сигнал ( $A_0$ ) при заполнении кюветы детектора (9) 1 мл 2 % раствора Triton X-100 (7, d), 1 мл ацетатного буферного раствора (рН = 4,5) (5, f). Значение аналитического сигнала соответствовало разнице между значениями  $A_n$  и  $A_0$ .

Аналитические характеристики разработанной методики представлены в табл. 5. Разработанная методика в отличие от ранее предложенных проточных аналогов обеспечила полную автоматизацию анализа, включая стадию извлечения антрахинонов из ЛРС и ЛП в раствор. Предложенная методика определения общего содержания антрахинонов позволяет устранить необходимость использования органических растворителей для извлечения аналитов и минимизировать расход реагентов.

**Табл. 5.** Аналитические характеристики циклической инъекционной спектрофотометрической методики определения антрахинонов в ЛРС и ЛП.

<b>Параметр</b>	<b>Оптимальное значение</b>
Концентрация Triton X-100 (%)	2
pH (ацетатный буферный раствор)	4,5
Температура извлечения (°C)	65 – 75
Объем экстрагента (мл)	1,5
Масса пробы (г)	0,1
Время извлечения (мин)	15
Диапазон определяемых концентраций (%)	0,65 – 23
Предел обнаружения (%)	0,2
Коэффициент корреляции	0,999
Sr, % (n = 5)	5
Производительность (проб/час)	9

Разработанная методика была использована для определения антрахинонов в различном ЛРС и ЛП. Расчет содержания антрахинонов в анализируемом растительном сырье осуществляли в пересчете на ализарин. Для проверки правильности методики проводили их параллельное определение методом последовательного инъекционного анализа (SIA), а также спектрофотометрическим методом в соответствии с фармакопейной статьей. Результаты, полученные методами ЦИА, SIA и референтным фармакопейным методом, были сравнены с помощью F- и t-тестов и представлены в таблице 6.

Полученные F-значения  $\leq 6,39$  указывают на незначительное различие в величинах стандартных отклонений, а полученные t-значения  $\leq 2,31$  указывают на то, что нет статистически значимого различия между результатами, полученными при помощи данных методик.

**Табл. 6.** Результаты определения общего содержания антрахинонов в ЛРС (n=5, P=0,95).

Проба	Общее содержание антрахинонов*, %						
	ЦИА	SIA	Фармакопейная статья	ЦИА – SIA		ЦИА – Фарм. статья	
				F- значение	t- значение	F- значение	t- значение
Корни и корневища марены	5,5 ± 0,1	5,5 ± 0,2	5,5 ± 0,3	2,08	1,03	2,82	2,20
Кора крушины	8,3 ± 0,1	8,2 ± 0,1	8,3 ± 0,3	1,01	1,70	3,15	0,22
Таблетки «Марены красильной экстракт»	2,8 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,8 ± 0,2	1,32	1,40	2,30	0,80

\* в пересчете на ализарин

## Выводы

1. Разработана общая аэрогидравлическая схема циклического инъекционного анализа лекарственного растительного сырья с ультразвуковым вскрытием проб.
2. Показана возможность минимизации кинетических ограничений при образовании комплексов флавоноидов с ионами алюминия (III) в средах цетилпиридиния хлорида.
3. Установлены условия извлечения флавоноидов, аскорбиновой кислоты и антрахинонов из лекарственного растительного сырья в раствор под действием УЗ для их экспрессного спектрофотометрического определения.
4. Разработана и аттестована методика циклического инъекционного спектрофотометрического определения флавоноидов в лекарственном растительном сырье (методика измерений № 01.06.155, свидетельство об аттестации № 01.5.03.178/01.00043/2014). Предел обнаружения флавоноидов в пересчете на рутин составляет 0,1 %. Производительность анализа – 8 проб/час.
5. Разработана методика циклического инъекционного спектрофотометрического определения аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье и продуктах питания. Предел обнаружения аскорбиновой кислоты составляет 0,003 %. Производительность анализа – 17 проб/час.
6. Разработана и аттестована методика циклического инъекционного спектрофотометрического определения общего содержания антрахинонов в лекарственном растительном сырье (методика измерений № 01.06.152, свидетельство об аттестации № 01.5.03.177/01.00043/2014). Предел обнаружения антрахинонов в пересчете на ализарин составляет 0,2 %. Производительность анализа – 9 проб/час.
7. Разработанные методики ЦИА апробированы на реальных пробах (различном лекарственном растительном сырье и продуктах питания). Правильность результатов подтверждена методами циклической вольтамперометрии, капиллярного электрофореза и SIA.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### **Список статей, опубликованных в журналах, содержащихся в перечне ВАК РФ:**

1. М.Т. Фалькова. Спектрофотометрическое определение флавоноидов в растительном сырье / А.В. Булатов, М.Т. Фалькова, М.О. Пушина, Л.Н. Москвин, Г.М. Алексеева // Аналитика и контроль. – 2012. – Т. 16. – № 4. – С. 358–362.
2. М.Т. Falkova. Stepwise injection spectrophotometric determination of flavonoids in medicinal plants / M.T. Falkova, M.O. Pushina, A.V. Bulatov, G.M. Alekseeva, L.N. Moskvin // Analytical Letters. – 2014. – V. 47. – P. 970–982.
3. М.Т. Falkova. On-line flow-batch based ultrasound-assisted surfactant-mediated extraction and determination of anthraquinones in medicinal plants / M.T. Falkova, M. Alexovič, M. Pushina, A. Bulatov, L. Moskvin, V. Andruch // Microchemical Journal. – 2014. – V. 116. – P. 98–106.

### **Список других работ:**

1. М.Т. Фалькова. Циклическое инъекционное спектрофотометрическое определение флавоноидов в растительном сырье / М.Т. Фалькова, А.В. Булатов, Л.Н. Москвин // Санкт-Петербургский международный форум «Фармацевтика. Медицинская промышленность. Биотехнологии». Санкт-Петербург. Сборник тезисов. – 2012. – С. 189–190.

2. М.Т. Фалькова. Циклическое инъекционное спектрофотометрическое определение флавоноидов в растительном сырье / М.Т. Фалькова, А.В. Булатов, Л.Н. Москвин, М.О. Пушина // Всероссийская школа-конференция «Химия биологически активных веществ» молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием «ХимБиоАктив-2012». Саратов. Тезисы докладов. – 2012. – С. 211–213.
3. М.Т. Фалькова. Циклическое инъекционное спектрофотометрическое определение содержания флавоноидов в лекарственном растительном сырье / М.Т. Фалькова, А.В. Булатов, М.О. Пушина, Л.Н. Москвин // LXXIII научно-практическая конференция «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины - 2012». Санкт-Петербург. Тезисы докладов. – 2012. – С. 31.
4. М.Т. Фалькова. Автоматизированное определение содержания флавоноидов в лекарственном растительном сырье / М.Т. Фалькова, А.В. Булатов, Л.Н. Москвин, М.О. Пушина // IV Всероссийская конференция «Аналитические приборы». Санкт-Петербург. Тезисы докладов. – 2012. – С. 107.
5. М.Т. Фалькова. Спектрофотометрическое определение флавоноидов в растительном сырье / М.Т. Фалькова, М.О. Пушина // VI Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев-2012». Санкт-Петербург. Тезисы докладов. – 2012. – С. 291.
6. М.Т. Фалькова. Автоматизированное определение аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье / М.О. Пушина, М.Т. Фалькова, А.В. Булатов, Л.Н. Москвин // Всероссийская школа-конференция «Химия биологически активных веществ» молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием «ХимБиоАктив-2012». Саратов. Тезисы докладов. – 2012. – С. 191–192.
7. М.Т. Falkova. Stepwise injection spectrophotometric determination of flavonoids in plant raw materials / A.V. Bulatov, M.T. Falkova, M.O. Pushina, L.N. Moskvin // XII International conference on Flow Analysis «Flow Analysis XII» Thessaloniki. Book of abstract. – 2012. – P. 144.
8. М.Т. Фалькова. Циклическое инъекционное спектрофотометрическое определение аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье / М.О. Пушина, М.Т. Фалькова, А.В. Булатов, Л.Н. Москвин // Первая зимняя молодежная школа-конференция с международным участием «Новые методы аналитической химии». Санкт-Петербург. Тезисы докладов. – 2013. – С. 93.
9. М.Т. Фалькова. «Зеленая аналитическая химия» и возможности проточного анализа / М.Т. Фалькова, М.О. Пушина, А.В. Булатов // VII Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам «Менделеев-2013». Санкт-Петербург. Тезисы докладов. – 2013. – С. 80-81.
10. М.Т. Фалькова. Циклическое инъекционное определение производных антрацена в лекарственном растительном сырье / М.О. Пушина, М.Т. Фалькова // VII Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам «Мендлеев-2013». Санкт-Петербург. Тезисы докладов. – 2013. – С. 152.
11. М.Т. Фалькова. Автоматизированное спектрофотометрическое определение аскорбиновой кислоты в лекарственном растительном сырье и продуктах питания / М.О. Пушина, М.Т. Фалькова, А.А. Екимов // III Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». Санкт-Петербург. Тезисы докладов. – 2013. – С. 266–267.

**12.** M.T. Falkova. Stepwise Injection determination of ascorbic acid in plant materials by capillary zone electrophoresis / A.Y. Shishov, M.T. Falkova, M.O. Pushina, A.V. Bulatov // 18<sup>th</sup> ICFA. Porto. Book of abstract. – 2013. – P. 156.

**13.** М.Т. Фалькова. On-line ультразвук-ассистированная мицеллярная экстракция антрахинонов для их SIA определения в лекарственном растительном сырье / М.Т. Фалькова, М. Alexovic, М.О. Пушина, А.В. Булатов, V. Andruch // VIII Всероссийская конференция с международным участием молодых ученых по химии «Менделеев-2014». Санкт-Петербург. Тезисы докладов. – 2014. – С. 341.

*Автор выражает искреннюю благодарность д.х.н., профессору Москвину Леониду Николаевичу, д.х.н., доценту Булатову Андрею Васильевичу за неоценимую помощь и поддержку при выполнении данной работы, глубокую признательность PhD, Associate Prof. Vasil Andruch и к.х.н., доценту Алексеевой Галине Михайловне за помощь в проведении исследований.*